

BIOLOGIA MOLECULAR

ACH5564-2023

AULA_11- EXPRESSÃO PROTEÍNA RECOMBINANTE EM EUCARIOTO

Prof. Luiz Paulo Andrioli

EXPRESSÃO SISTEMA PROCARIONTE

- O conhecimento do modelo, a facilidade de manipulação e o rápido crescimento de *E coli* tornaram essa bactéria ideal para a expressão de proteínas industrializadas, muitas delas ainda realizadas e atendendo inúmeras aplicações;
- Além de ter possibilitado a obtenção de proteínas eucariotas simples como hormônios e fatores de crescimento;

EXPRESSÃO SISTEMA PROCARIONTE

MAS,

1) Existe a possibilidade de contaminantes bacterianos estarem presentes no produto final mesmo após etapas de purificação;

Esses produtos podem ser tóxicos, causar alergias ou pirogênicos (aumentam a temperatura do corpo), no caso de agentes terapêuticos.

EXPRESSÃO SISTEMA PROCARIONTE

ALÉM DISSO,

2) muitos produtos eucariotos nem sempre são obtidos com atividade biológica esperada e/ou são instáveis,

O QUE NORMALMENTE,

decorre do fato das bactérias não realizarem modificações pós-traducionais como é realizado nas células eucariotas:

EXPRESSÃO SISTEMA PROCARIONTE

- Formação de pontes dissulfeto entre cisteínas (ineficiente e ocorre basicamente no periplasma);
- Necessidade de chaperonas específicas para correto *folding* e eliminação de proteínas incorretas;
- Inexistência de mecanismos para adição de grupos extras como ácidos graxo, acetil, fosfato, sulfato em aceptores específicos;
- Correta clivagem de proteínas (proteínas são sintetizadas como precursores inativos que necessitam de proteases para clivagem em sítios específicos gerarem a forma ativa);
- Glicosilação, que não tem a diversidade e complexidade de açúcares que modificam as proteínas eucariotas.

EXPRESSÃO SISTEMA EUCARIONTE

- Para contornar as dificuldades do sistema de expressão em bactérias, foram buscadas alternativas de expressão em eucariotos:
- LEVEDURAS;
- CÉLULAS (INSETOS);
- CÉLULAS (MAMÍFEROS).

EXPRESSÃO SISTEMA EUKARIOTE

- A expressão de proteína recombinante em eucariotos possibilita não só recuperar as propriedades normalmente encontradas nas proteínas eucariotas,

MAS TAMBÉM,

- gerar novas modificações pós-traducionais e obter novas propriedades para proteínas recombinantes, eventualmente mais eficientes do que as proteínas originais.

EXPRESSÃO SISTEMA EUCARIONTE

MESMO ASSIM,

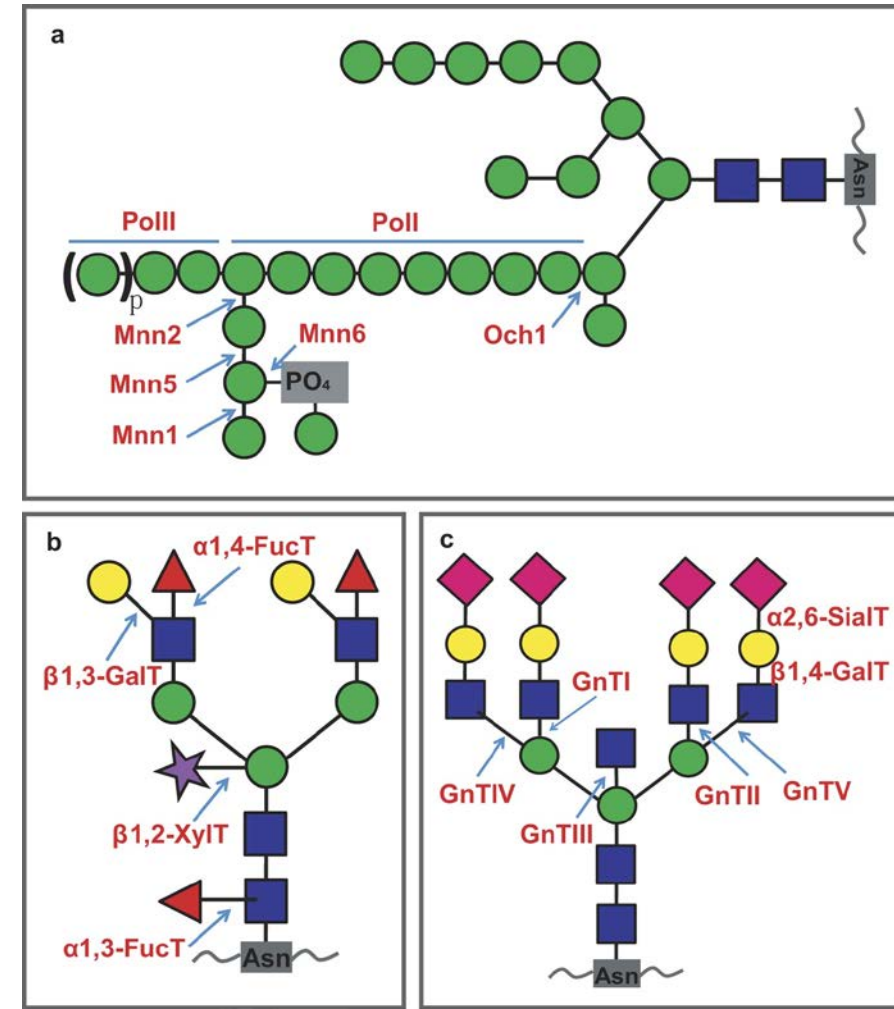
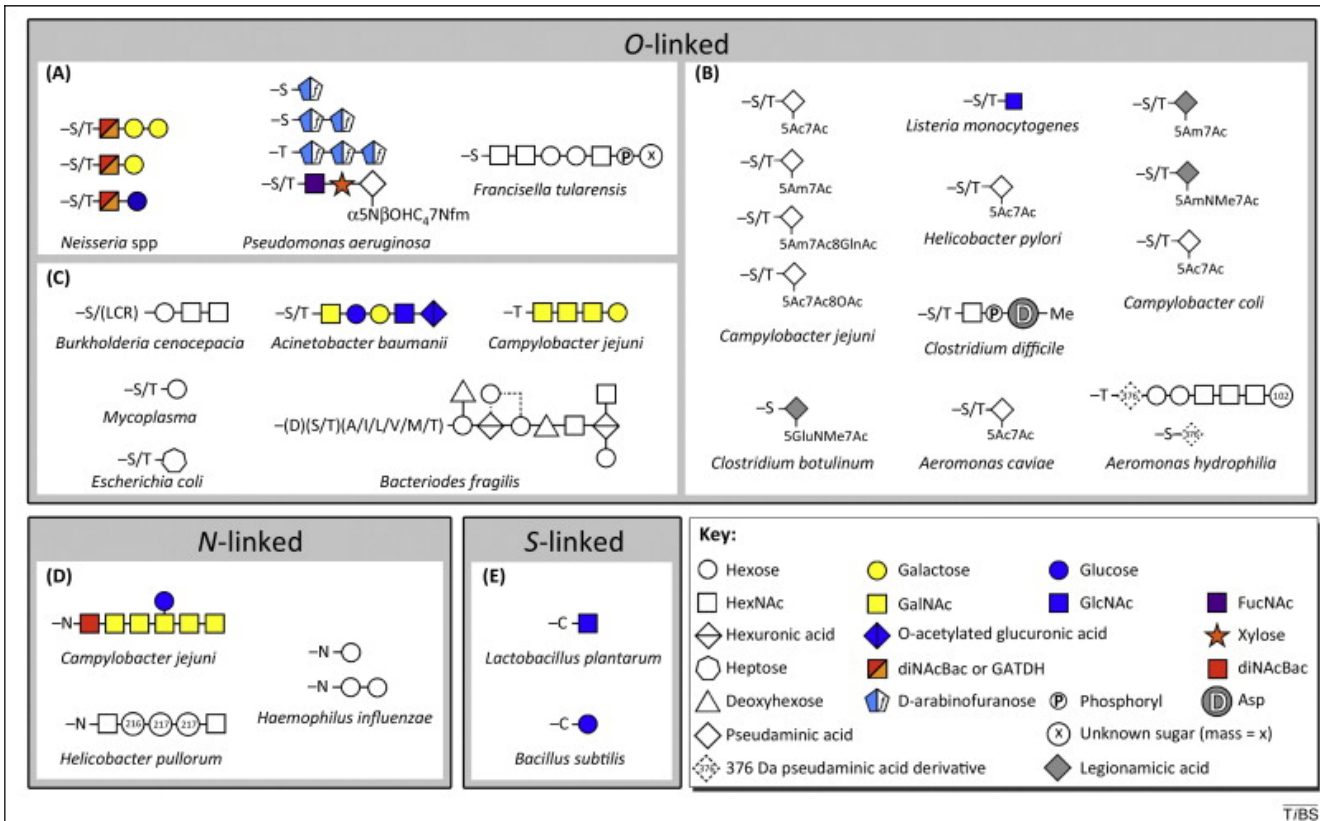
- diferentes condições de expressão, alterações no sistema celular de expressão e de vetor, e até mesmo mudanças de um sistema celular para outro,
- eventualmente são testadas para obter a melhor qualidade de proteína recombinante, em primeiro lugar,
OU,
- levando em conta outras considerações como rendimento e os custos de produção e purificação.

EXPRESSÃO SISTEMA EUCARIONTE

A CONCLUSÃO,

É a de que não existe um sistema de expressão universal e efetivo de proteínas...

DIFERENÇAS DE GLICOSILAÇÃO

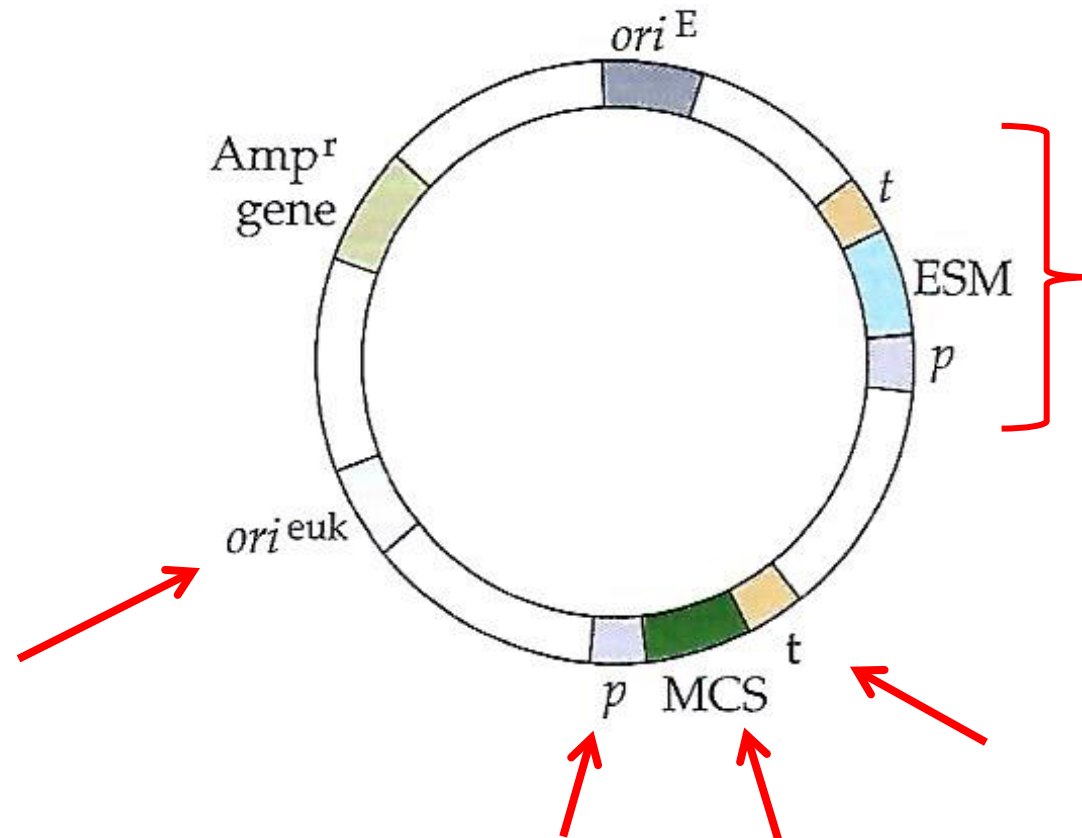


EXPRESSÃO SISTEMA EUCARIONTE

- **REQUERIMENTOS PARA EXPRESSÃO EM SISTEMA EUCARIOTO**
- Similares em relação aos procariotos:
- Vetor com capacidade para se manter em célula eucariota (origem de replicação);
- Marcador para seleção eucarioto;
- Promotor, término de transcrição eucarioto;
- Sinal para poliadenilação;
- Múltiplos sítios de clonagem;
- Sítios para início/ término de tradução para proteínas de fusão.

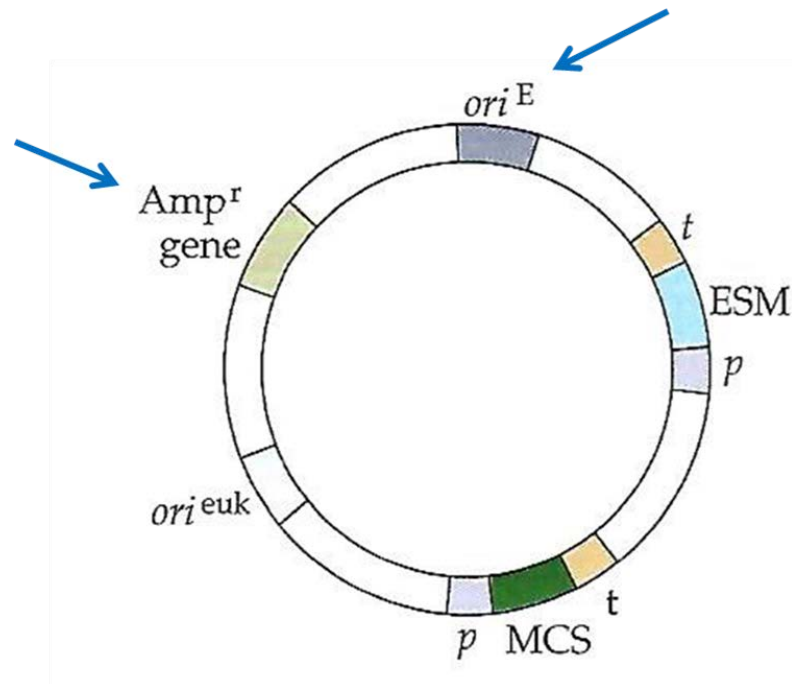
EXPRESSÃO SISTEMA EUCARIONTE

- CARACTERÍSTICAS GERAIS DE UM VETOR PARA EXPRESSÃO EM SISTEMA EUCARIOTO



EXPRESSÃO SISTEMA EUCARIONTE

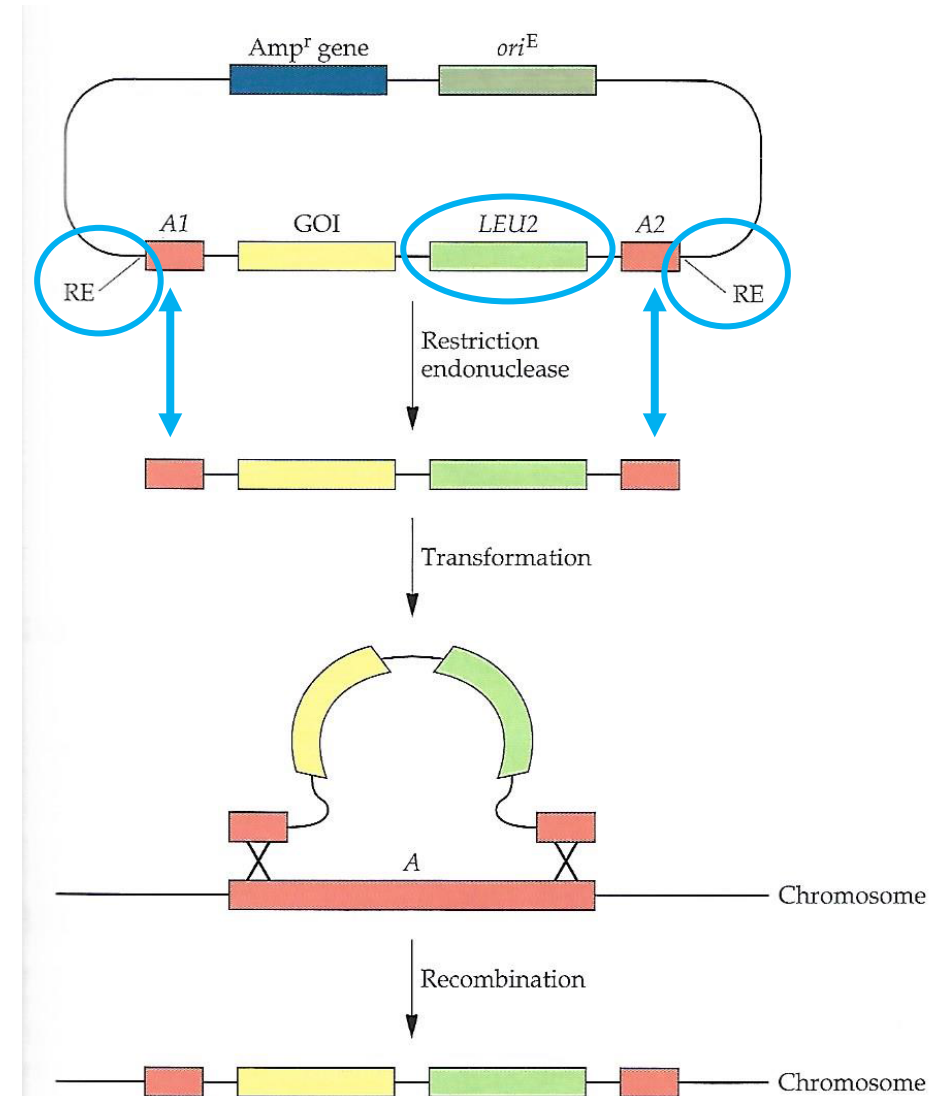
- **REQUERIMENTOS PARA EXPRESSÃO EUCARIOTO**
- **SHUTTLE VECTORS:** Vetores com capacidade de transitar em células procariotas e eucariotas (origem de replicação e marcador de resistência para ser capaz de replicar e ser selecionado em células bacterianas e eucariotas).



EXPRESSÃO SISTEMA EUCARIONTE

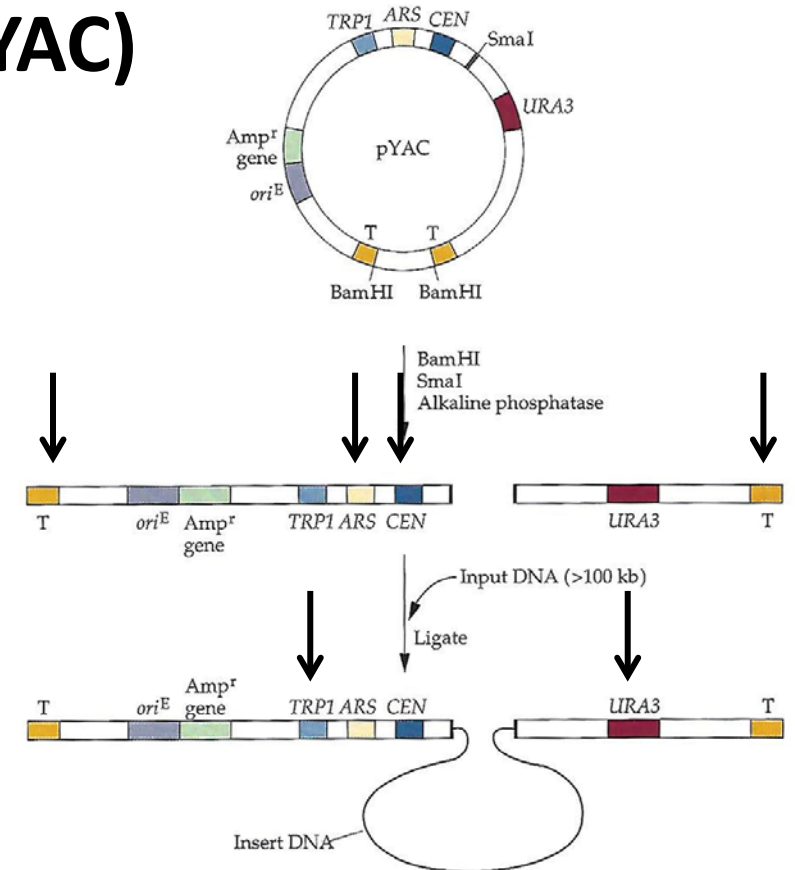
• REQUERIMENTOS PARA EXPRESSÃO EUCARIOTO

- **INTEGRAÇÃO:** O vetor plasmidial tb pode ser confeccionado sem origem de replicação eucariota;
- Mas com sequências no vetor, homólogas à sequências do genoma hospedeiro, para possibilitar a integração no genoma;
- Essas sequências (A1 e A2), são extremidades de um gene (ou de outra região do genoma), não essencial que é trocado pela construção;
- Ao lado das sequências, estão sítios de restrição (RE) para linearizar a construção e favorecer a recombinação homóloga;
- Marcadores de seleção em levedura comumente utilizados são enzimas da via metabólica de aas como LEU2, de linhagens auxotróficas.



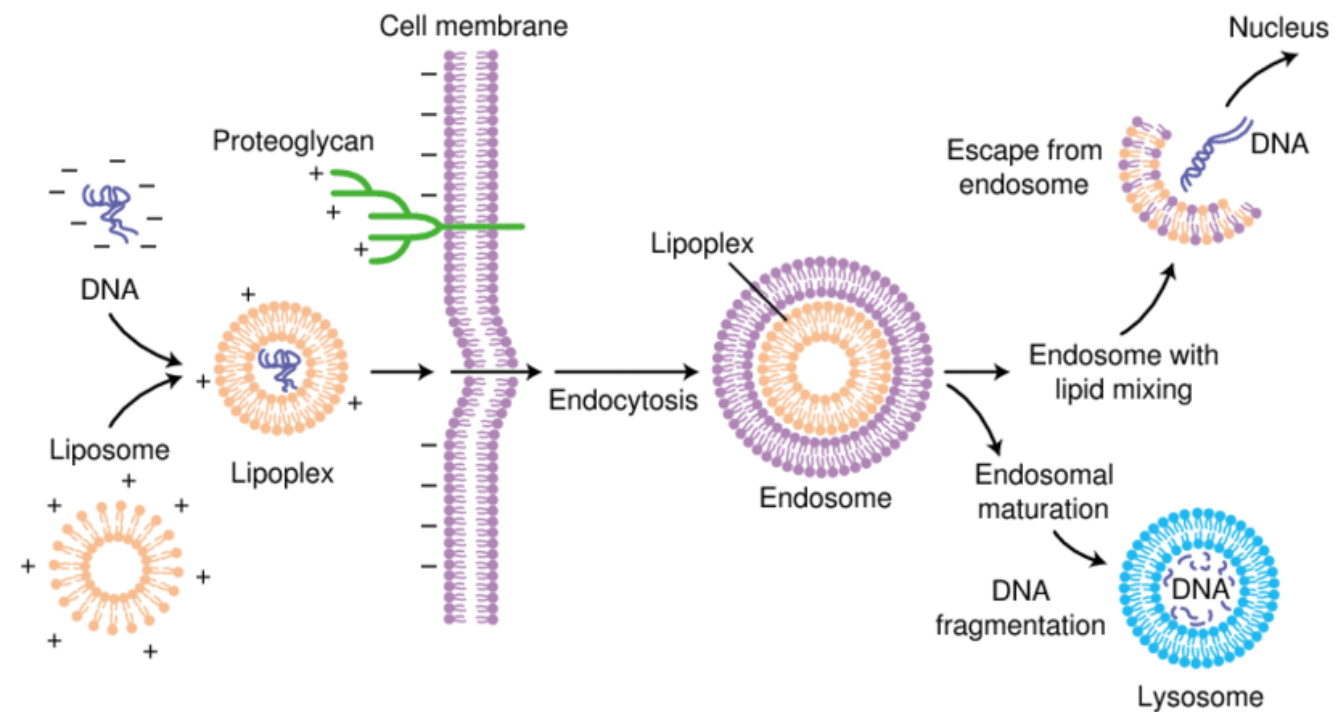
EXPRESSÃO SISTEMA EUCARIONTE

- **REQUERIMENTOS PARA EXPRESSÃO EUCARIOTO**
- **VETORES** utilizados para expressão em célula eucariota: Além dos plasmídeos, vírus hospedeiro-específicos ou cromossomos artificiais.
- **CROMOSSOMO ARTIFICIAL DE LEVEDURA (YAC)**
 - Insertos de até 100 kb;
 - Vetor possui sequências teloméricas (T), centroméricas (CEN) e de origem de replicação (ARS) conferindo características de cromossomo a construção;
 - Marcadores em levedura comumente utilizados são enzimas da via biosintética de aas, de linhagens auxotróficas (TRP1/ URA3).



EXPRESSÃO SISTEMA EUCARIONTE

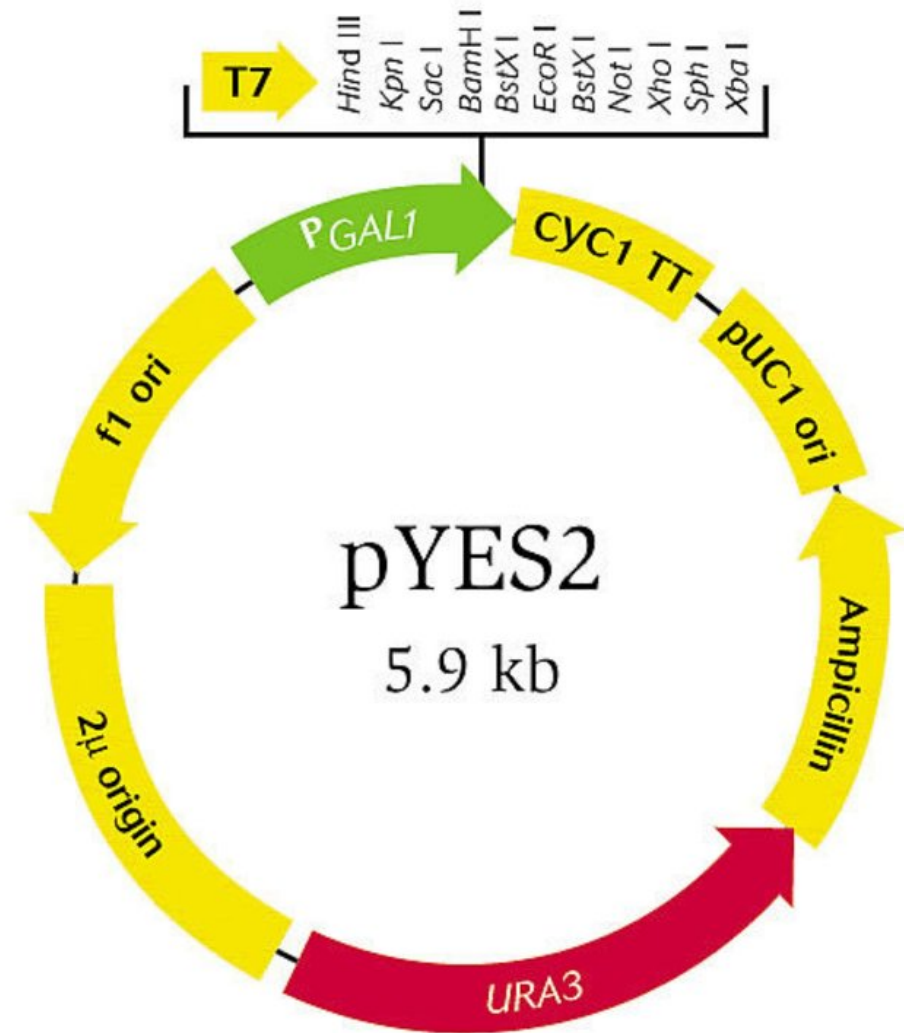
- **REQUERIMENTOS PARA EXPRESSÃO EUCARIOTO**
- **TRANSFORMAÇÃO/ TRANSFEÇÃO:** O termo transformação (introdução da construção molecular na célula) é usado para levedura, mas, transfecção para sistemas celulares eucariotos (insetos, mamíferos).
- Método de transformação/ transfecção: eletroporação, tratamentos com sais para desestabilizar membrana;
- Complexos DNA-lipídeos, complexos DNA- proteínas, bombardeamento de partículas também podem ser utilizados para transfecção.



EXPRESSÃO EM LEVEDURA

- **VETOR PLASMIDIAL:**

- Plasmídeos de ocorrência natural como o 2 μ m (2 micra, originalmente mantidos em 30 cópias na célula);
- Já estabelecidos como vetores *shuttle*;
- Também podem ser utilizados para integrar a construção molecular no cromossomo da levedura;
- Secreta poucas proteínas, então, o produto pode ser direcionado para a secreção (por exemplo, com sinal dos fatores de acasalamento).



EXPRESSÃO EM LEVEDURA

- **VANTAGENS:**

- Usado como organismo modelo em biologia há muito tempo- bioquímica e genética conhecidas, genoma sequenciado desde 1996;
- Protocolos de biologia molecular e de produção em grande escala disponíveis para a espécie;
- Organismo aceito e considerado seguro- já muito utilizado na produção de agentes terapêuticos;
- Cresce facilmente em pequena escala e em biorreatores com meios de crescimento de baixo custo;
- Capazes de produzir grande quantidade de proteínas recombinantes, e realizar muitas das modificações pós-traducionais de proteínas eucariotas.

EXPRESSÃO EM LEVEDURA

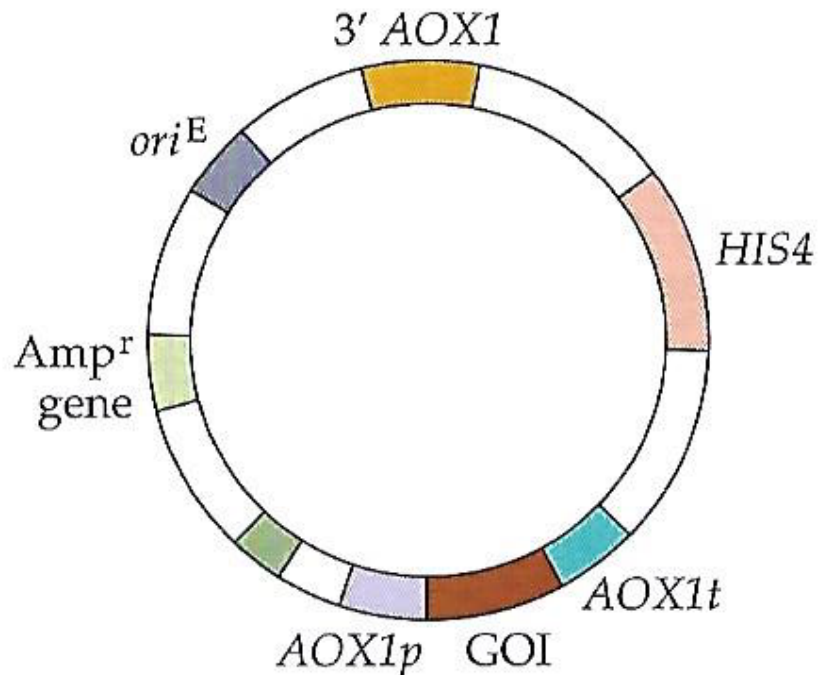
- **DESVANTAGENS:**

- Podem não expressar em grandes quantidades;
- Plasmídeos perdidos durante crescimento nos biorreatores;
- Proteínas direcionadas para secreção podem ficar retidas entre membrana e parede celular;
- Glicosilação apenas para proteínas secretadas e geralmente excessivas.

**OUTRAS LEVEDURAS E FUNGOS ESTÃO SENDO
UTILIZADOS COMO FORMAS ALTERNATIVAS**

Pichi pastoris

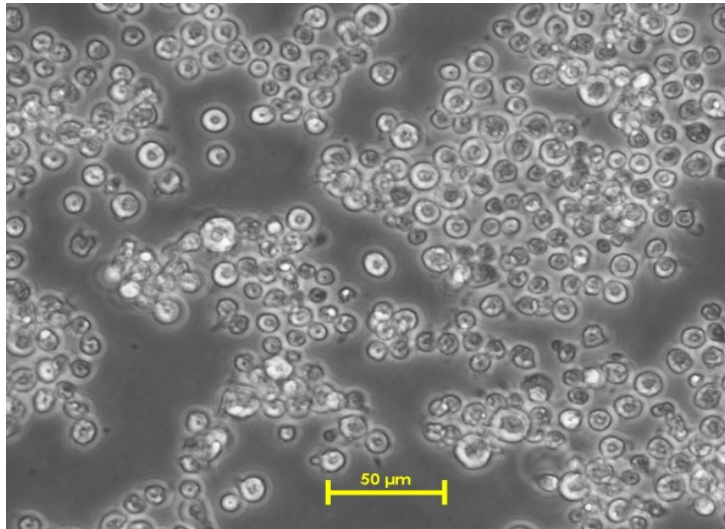
- Fungo que usa metanol como fonte de energia e não carbono;
- Insere menos modificações nos açúcares (manose) do que a levedura;
- Modificada para “humanizar sua glicosilações”.



Vetor para integração no genoma e expressão da proteína recombinante; Nesse caso um vetor com promotor forte do metabolismo do metanol.

SISTEMA de EXPRESSÃO em CÉLS INSETOS

- Várias culturas de células disponíveis (cultura *ex vivo*)



*Schneider cells,
Drosophila melanogaster*



Autographa californica



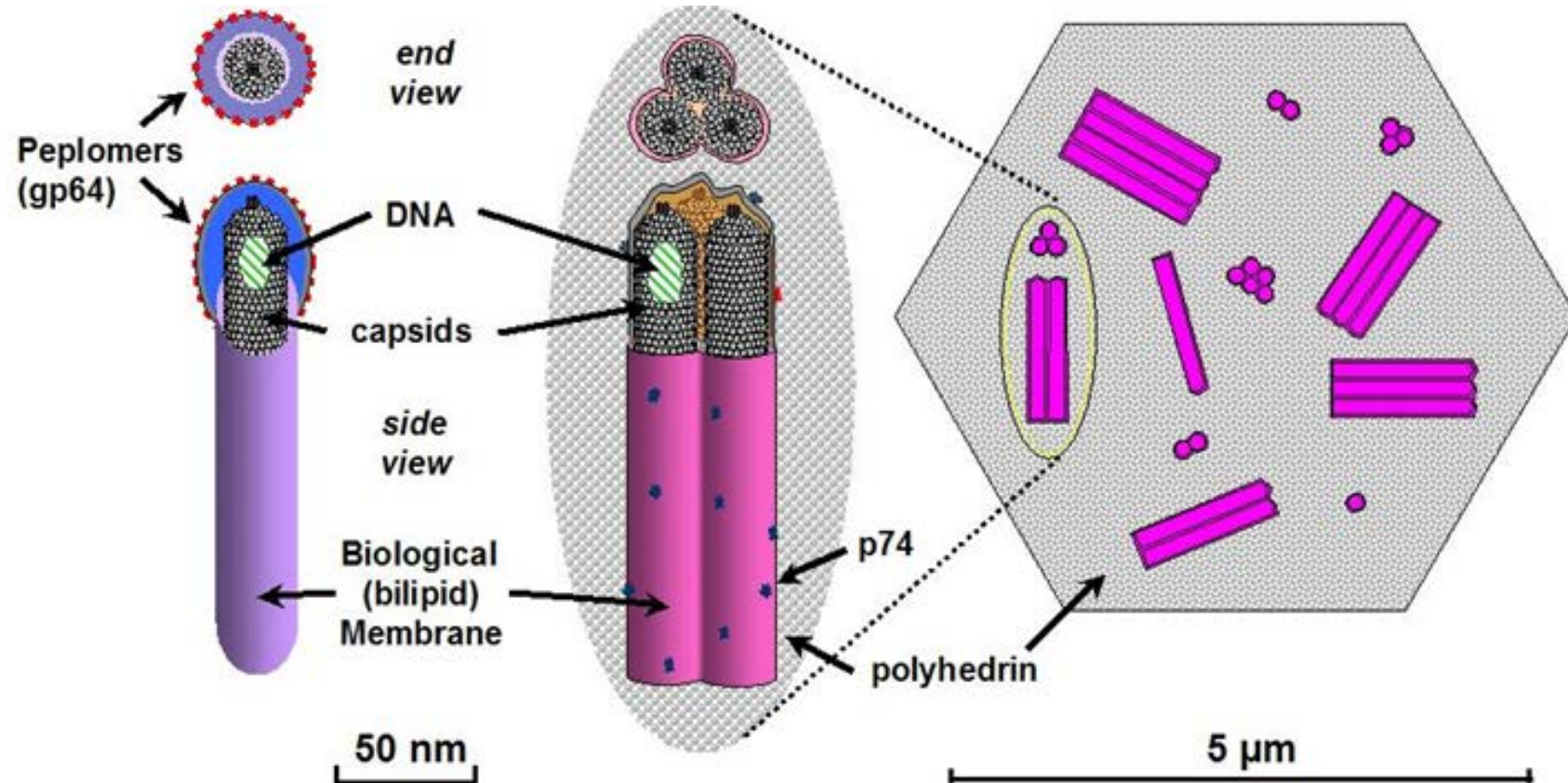
Spodoptera frugiperda



SISTEMA de EXPRESSÃO em CÉLS INSETOS

- **VETOR**

- Família dos baculovírus;
- Infectam especificamente artrópodes, principalmente insetos;
- Fora do corpo do hospedeiro, as partículas virais estão reunidas e embebidas em uma matriz proteica protetora de poliedrina;
- Quando ingeridos pelos insetos, poliedrina é dissolvida no intestino e partículas virais infectam as células do hospedeiro



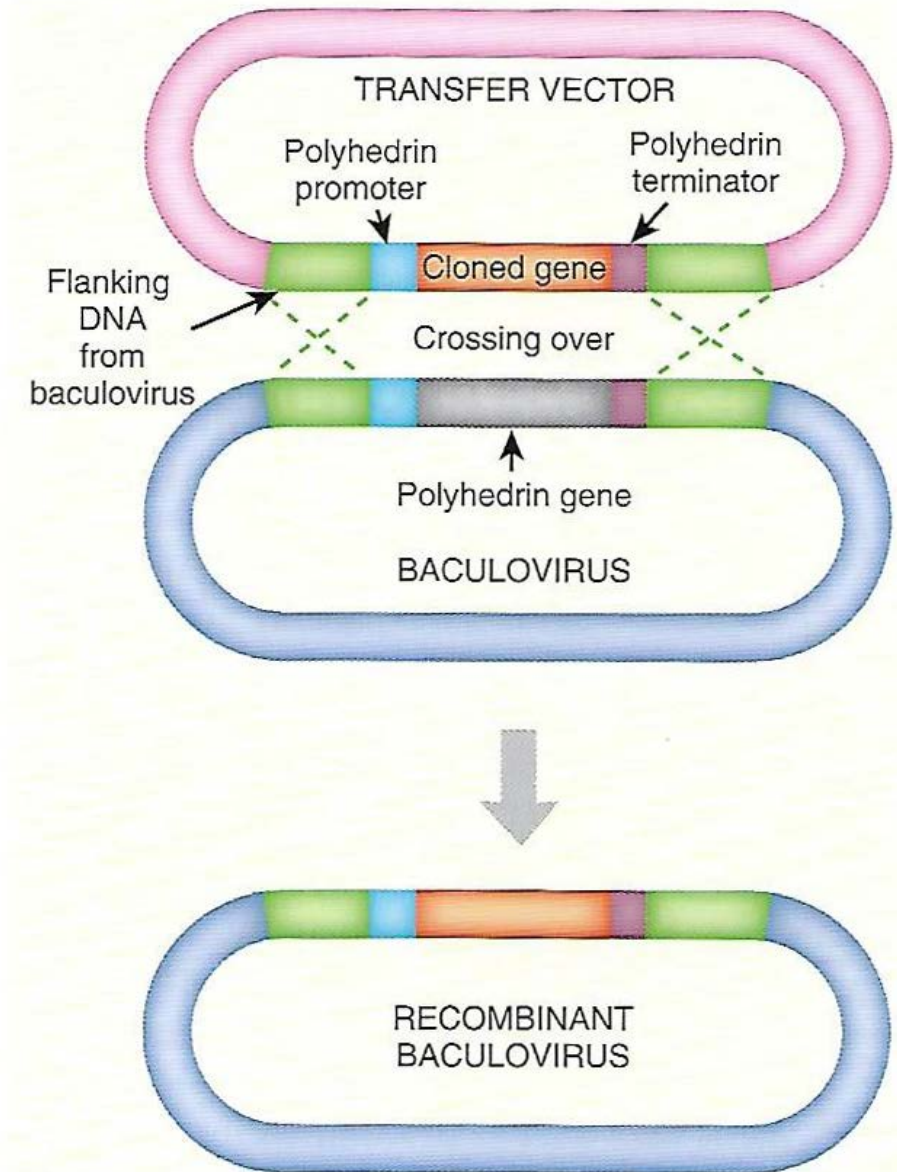
SISTEMA de EXPRESSÃO em CÉLS INSETOS

- **VETOR**

- A poliedrina é sintetizada nos estágios finais da infecção, por vários dias, e em grande quantidade;
- As partículas virais são embebidas com a matriz de poliedrina, formando poliédrons;
- Que são liberados no meio após a morte do hospedeiro;
- O gene da poliedrina foi direcionado para a expressão de proteínas recombinantes porque;
- A poliedrina não é uma proteína necessária para a produção viral, podendo ser substituída;
- E seu promotor chega a gerar 25% do total de RNAm produzido por um célula infectada.

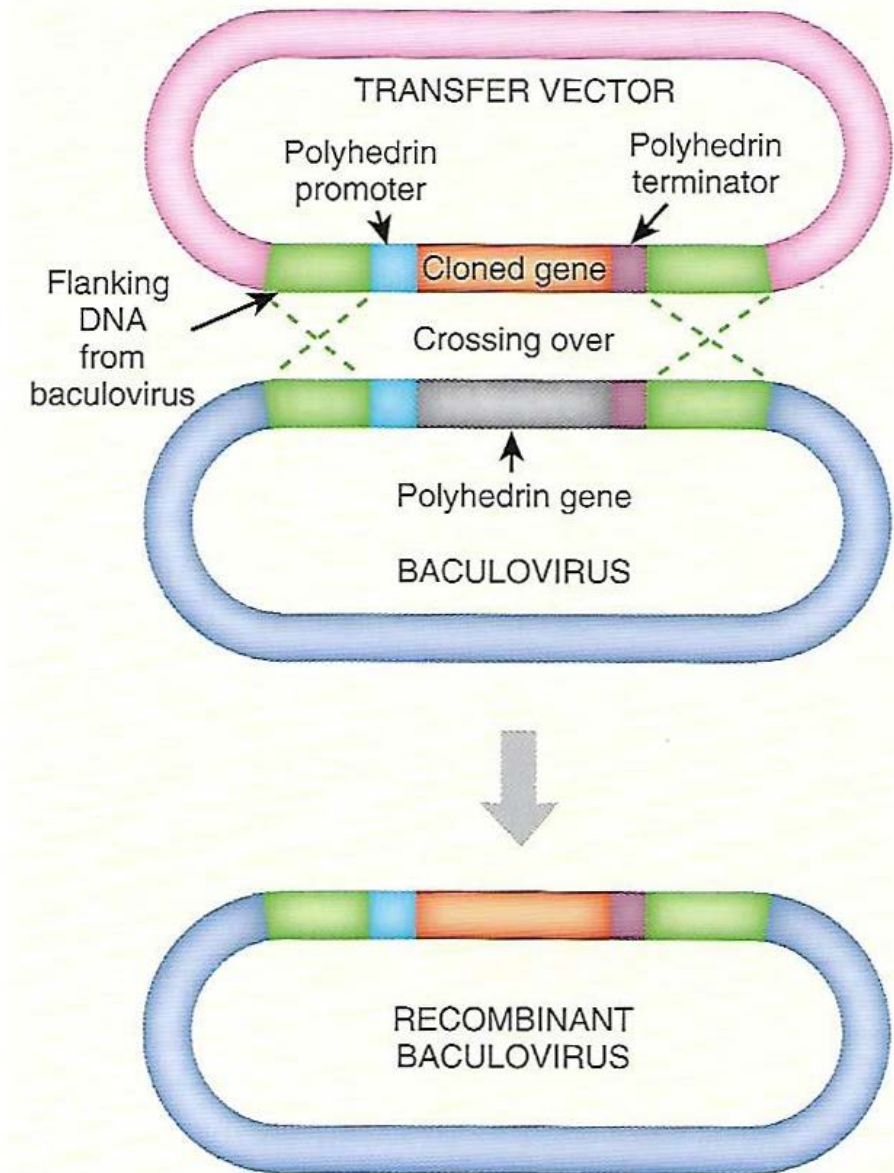
SISTEMA de EXPRESSÃO em CÉLS INSETOS

- **VETOR: MNPV (vírus poliedrose nuclear múltipla)**
- Uma possibilidade é construir um vetor bacteriano com sequências do gene da poliedrina (contendo seu promotor e terminador e sequência adjacentes para recombinação) substituindo o cDNA original por um MSC;



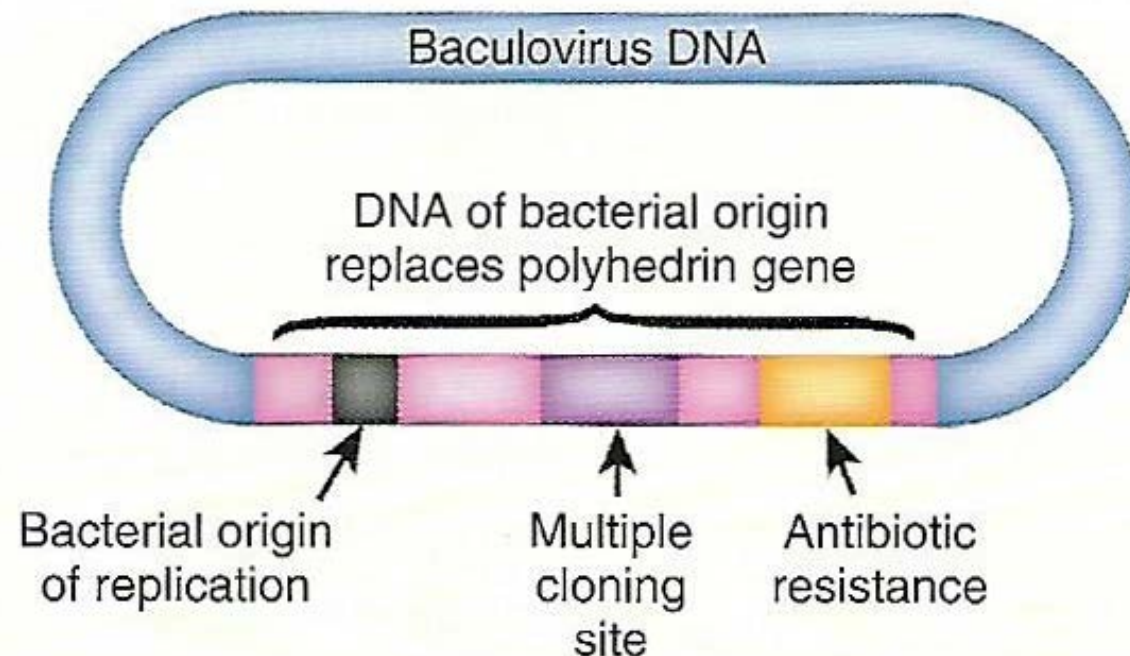
SISTEMA de EXPRESSÃO em CÉLS INSETOS

- **VETOR: MNPV** (vírus poliedrose nuclear múltipla)
- Coinfecção desse plasmídeo contendo gene de interesse com o vírus possibilitará a recombinação homóloga e geração do baculovírus recombinante na célula do inseto;
- Origem de replicação viral e das proteínas do capsídeo e empacotamento possibilitam a geração de partículas virais e a infecção de novas células.



SISTEMA de EXPRESSÃO em CÉLS INSETOS

- **VETOR: MNPV (vírus poliedrose nuclear múltipla);**
- Outra possibilidade é a utilização de um baculovídeo: um plasmídeo (shuttle) para ser utilizado em bactéria e transfectar as células de insetos.



SISTEMA de EXPRESSÃO em CÉLS INSETOS

- Vantagem em relação aos fungos e leveduras: modificações pós-traducionais mais próximas das realizadas em células de mamíferos;
- Vantagens em relação a cultura de células de mamíferos: mais resistentes e crescidas em meios mais simples;
- Células de mamíferos mais delicadas e meios mais complexos (e caros);
- Várias centenas de proteínas eucariotas já foram obtidas com sucesso utilizando sistema de células de insetos e vetor baculovírus;
- Por exemplo, a vacina contra papilomavírus humano.

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- O sistema de expressão em células de mamíferos oferece como grande vantagem as condições necessárias para realizar modificações pós-traducionais, principalmente de glicosilações, que muitas vezes não podem ser realizadas em outros sistemas;
- Proteínas recombinantes são secretadas e são proteínas majoritárias no meio de cultura, facilitando a purificação e diminuindo os custos de produção;
- Grande desvantagem são as condições especiais de cultura (37°C, em presença de CO₂ e soro), mais complexas e onerosas;
- E algumas vezes, baixo rendimento do sistema baseado na integração de cópias no genoma.

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- O ativador de plasminogênio de tecido humano (Activase tPA) utilizado no tratamento de trombose foi o primeiro biofármaco obtido a partir de células de mamíferos a ser aprovado em 1986;
- Aproximadamente metade de todos produtos terapêuticos humanos são atualmente produzidos em culturas de células de mamíferos;
- As células CHO (ovário de hamster chinês) foram utilizadas para produzir Activase tPA e talvez ainda seja o tipo celular mais utilizado;

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- São capazes de crescer em suspensão na ausência de soro e são facilmente transfectadas e utilizadas para expressão de vetor plasmidial não integrado ou para integração no genoma.
- As células CHO fazem modificações de glicosilação tipicamente humanas;
- Apresentam altos níveis de expressão proteica e um histórico bem estabelecido de segurança e aprovação regulatória.

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- Várias outras células isoladas a partir de humanos, macacos e camundongos dentre outros tb são utilizadas;
- Como HEK 293 (rim de embrião humano), BHK (rim de feto de hamster);
- Dois procedimentos principais são utilizados na produção de proteínas recombinantes:
- Produção estável de proteína, que depende da integração no genoma;
- Produção instável, que não necessita integração.

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- **PRODUÇÃO ESTÁVEL**

- Produção de proteína em grande quantidade com a integração da construção gênica no genoma e a possibilidade de selecionar e manter clones produtores;
- Em geral, realizado com células em suspensão;
- Pode ser selecionada de diferentes formas;
- O endereçamento pode ser realizado com plasmídeos;
- Que é um vetor mais fácil de construir e manipular, além de ser mais barato e seguro em relação aos vírus;
- Mas tem como desvantagem o tamanho da construção (em relação aos vírus).

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- **PRODUÇÃO INSTÁVEL**

- Produção de proteína transiente (1 -14 dias), porque a construção não é selecionada e nem integrada no genoma.
- Em geral realizada por construção plasmidial que pode ser transfectada de forma eficiente e simples por diferentes métodos de transfecção de DNA;
- A cultura é crescida em suspensão celular;
- Tem como limitação a produção em pequena escala;
- Método relativamente simples e menos oneroso que pode ter suas aplicações (como ensaios pré-clínicos).

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

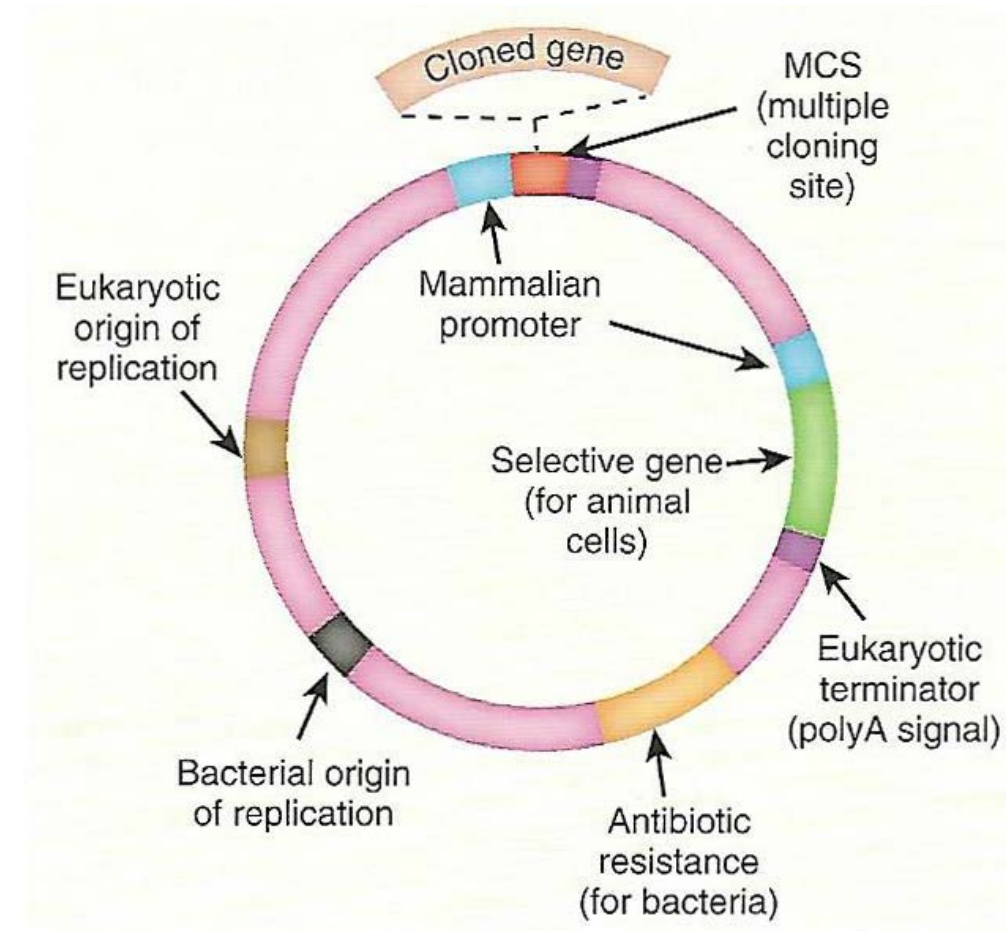
- **VETOR VIRAL**

- Vetores usualmente utilizados são baseados em vírus (retrovírus) que infectam células de mamíferos;
- O SV40 é muito utilizado;
- São removidos genes da infecção precoce e tardia, mas deixado promotor tardio utilizado para o vírus produzir proteínas do capsídeo;
- A desvantagem do SV40 é o tamanho do inserto que tem que ser pequeno pela restrição de tamanho no empacotamento;
- Outros vírus como adenomavírus e papilomavírus comportam tamanhos maiores nos seus capsídeos;
- São utilizados como carregadores de construções para serem integradas no genoma, gerando uma condição estável.
- Ou possibilitam a transfecção e expressão transiente, por exemplo, usando baculovírus;

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

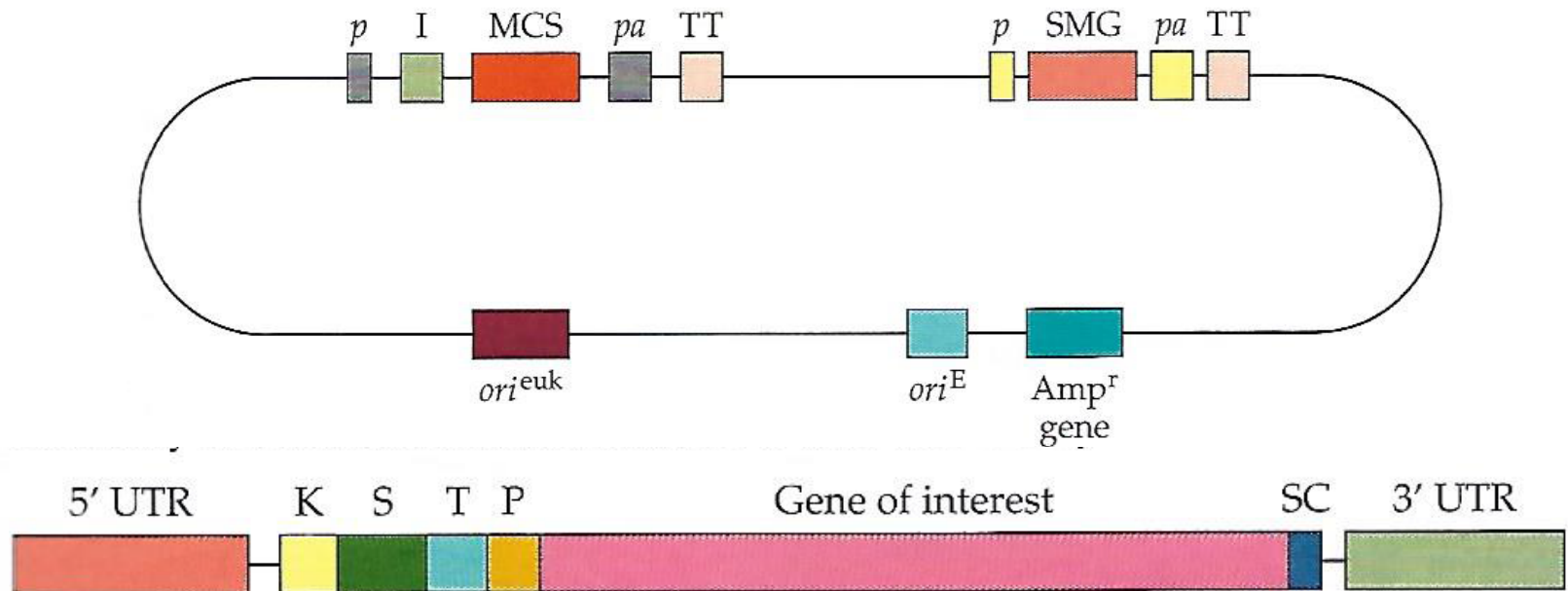
• VETOR PLASMIDIAL

- Vetores plasmidiais *shuttle* precisam conter origem de replicação e seleção para bactéria;
- Origem para replicação em células eucariotas e promotores fortes;
- Em geral de vírus, como do SV40 (vírus símio 40);
- Ou de genes eucariotos expressos em grande quantidade (somatotropina, actina e metalotioneína);
- MSC após o promotor.
- Além disso...



SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- **VETOR**
- Sequência de término de transcrição incluindo sítio de poliadenilação 3';
- A presença de um íntron tb intensifica a expressão da proteína recombinante;
- Sequências a 5' do cDNA que aumentem a eficiência de tradução (sequência Kozak);
- Que pode ser seguida de um *tag* para secreção; de purificação; e de clivagem da fusão;
- Sítio ATG em fase no MCS e códon de terminação.



SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- **PERDA DA EXPRESSÃO**
- A expressão na forma de plasmídeo é transiente e inevitavelmente resulta na sua perda;
- A integração também é suscetível a baixa expressão ou sua diminuição com o tempo, pelo efeito do silenciamento gênico.
- O silenciamento gênico decorre de integrações próximas a regiões de heterocromatina.

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

• INTEGRAÇÃO

- Algumas estratégias podem ser utilizadas para a manutenção de eucromatina ativa;
- Geração de linhagens que expressem proteínas que controlam a compactação da cromatina;
- Por exemplo, de histona acetiltransferase, que cria condições mais permissivas para a expressão;
- Ou de elementos que inibam o espalhamento da heterocromatina;
- Que podem estar na mesma construção do gene de interesse ou ser integrado separadamente próximo a este.

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- **SELEÇÃO**

- Alguns antibióticos podem ser utilizados para a seleção de células eucariotas como a geneticina (G-418), que bloqueia síntese proteica;
- Nesse caso, utiliza-se marcador neoR que inativa o antibiótico;
- Linhagens de CHO defectivas na expressão de dihidrofolato redutase (DHFR), da via de síntese do ácido fólico;
- São mantidas em meio suplementado com glicina, hipoxantina e timidina;
- Mas podem ser complementadas com plasmídeo da construção do gene de interesse expressando a enzima DHFR funcional sob controle de um promotor fraco;
- Apenas várias cópias integradas possibilitam a viabilidade e seleção.

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- **SELEÇÃO**
- O gene da glutamato sintetase (gs), também é usado para seleção em linhas celulares que contenham sua GS endógena baixa, em linhagem celular NS0 (de mieloma de camundongo), por exemplo;
- Após transfecção com o gene gs e o gene recombinante, as células são mantidas em meio sem glutamato.
- Após seleção utilizando DHFR ou GS, a expressão do gene recombinante pode ser significativamente aumentada pela exposição das células a drogas que bloqueiam a atividade das enzimas marcadoras de seleção;
- Metotrexato (MTX) e metionina sulfoximina (MSX) inibem respectivamente DHFR e GS;

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- **SELEÇÃO**
- A maioria das células morre após 2–3 semanas de exposição ao MTX, enquanto algumas sobrevivem devido a um nível suficientemente alto de DHFR;
- Um mecanismo de amplificação gênica possibilita de centenas até poucos milhares de cópias estejam presentes;
- Produzindo grande quantidade da proteína recombinante, um problema do sistema de expressão celular baseado na integração genômica;
- Por outro lado, o número de cópias pode gerar instabilidade cromossômica por recombinação.

SISTEMA EXPRESSÃO em CÉLS MAMÍFEROS

- **RENDIMENTO**

- O aumento da produção de proteína recombinante em células de mamíferos necessita contornar os efeitos gerados pelo consumo de nutrientes e o aumento de produtos tóxicos gerados ao longo do tempo em biorreatores;
- Por exemplo, com a diminuição das concentrações de oxigênio no meio, algumas células desviam a conversão da glicose para piruvato e passam a gerar lactato, que é secretado e acidifica o meio;
- Para contornar, expressar piruvato carboxilase em maiores concentrações;
- O acúmulo de produtos tóxicos geram condições de estresse e muitas vezes as células respondem com apoptose;
- Uma forma de contornar esse problema, é inibir e degradar a p53 proteína chave no processo que direciona para apoptose.